

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 225–230

Mikrobestimmung von Glucose mit Glucosedehydrogenase bei bestimmungsunabhängiger Probenvorbereitung im Routinelaboratorium

Von W. Stein, I. Mildner und R. Maulbetsch

Aus der Medizinischen Klinik, Abteilung für Innere Medizin IV (Direktor Professor Dr. M. Eggstein) Tübingen

(Eingegangen am 4. Juli/6. Oktober 1977)

Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Gotthard Schettler zum 60. Geburtstag

Zusammenfassung: Eine Mikromethode zur Bestimmung der Glucose im Blut mittels Glucosedehydrogenase im Routinelaboratorium wird für den Autoanalyser II und als manuelle Methode beschrieben. Die Probennahme von 20 µl Kapillarblut und Enteiweißung mit Uranylacetat vereinfacht den Analysengang am Autoanalyser II und ermöglicht auch die manuelle Verarbeitung derselben Probe. Präzision und Richtigkeit sind der Bestimmung mit der Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode vergleichbar. Elf-monatige Erfahrung zeigt Praktikabilität und ökonomische Handhabung der Methode.

Microdetermination of glucose using glucose dehydrogenase, with independent sample preparation in the routine laboratory

Summary: A micromethod for the determination of glucose in 20 µl of capillary blood using glucose dehydrogenase is described. After deproteinisation with uranyl acetate, the samples are analysed by an Autoanalyzer II method or by a manual procedure. Precision and accuracy are well correlated with the hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase method. Eleven months experience have shown the practicability and economic advantages of this method.

Einleitung

Die Glucoseoxidase-Perid-Methode erbrachte in unserem Laboratorium einen Variationskoeffizienten von knapp 5% für die Glucosebestimmung in Kapillarblut. Den Ansprüchen an einfache und schnelle Handhabung wurde sie nicht mehr gerecht.

Eine Nachfolgemethode muß folgenden Forderungen entsprechen:

1. einfach durchführbare, gegen Störungen wenig empfindliche chemische Reaktionen mit geringem Enzymverbrauch,
2. geringe Probenmenge und Probennahme auch durch nichtärztliches Personal,
3. uniforme Probenvorbereitung und -entnahme, d. h. manuelle bzw. seriell-mechanisierte Bestimmungen sollten keine unterschiedlichen Probennahmen und Probenvorbereitungen verlangen,
4. positive Probenidentifizierung.

Mit der Glucosedehydrogenase¹⁾-Methode (1, 2, 3, 4) steht eine Glucosebestimmung zur Verfügung, die diese

Voraussetzungen erfüllen und die als Fortschritt zu bisherigen Verfahren empfohlen werden kann.

Die kapillare Mikro-Probennahme (5) wird seit Jahrzehnten bei uns bevorzugt; sie berücksichtigt die klinisch praktischen Belange (Kinder, engmaschiges Profil) und erlaubt auch die Selbstabnahme durch den Patienten.

Eine Enteiweißung der Blutproben vereinfacht den Analysengang der Methode und kann für Autoanalyser und manuelle Bestimmung in gleicher Weise erfolgen. Außerdem läßt sich der Überstand nach Enteiweißung auch zur Glucosebestimmung am Automatischen Klinischen Analysator ACA (Dupont) verwerten (6).

Das direkte Einsetzen des Abnahmegefäßes in den Probenteller des Autoanalyzers II ermöglicht eine positive Probenidentifizierung, wie sie bei größeren Meßserien und Rechnereinsatz wünschenswert ist (7).

Verbrauchsmaterial und Geräte

Materialien

Lanzetten (Firma ASID, München).
Heparinisierte Glaskapillaren 20 µl (Firma Biotechnik, Hamburg).
Mikrogefäße (Firma Eppendorf, Hamburg).
Spezialpapier für den Schreiber (Firma Blumberg, Ratingen).

¹⁾ β-D-Glucose: NAD-Oxidoreduktase EC 1.1.1.47. Mutarotase: Aldose-1-epimerase EC 5.1.3.3.

Reagenzien

Arbeitslösungen für die Glucosedehydrogenase-Methode

1. Enteiweißungsmittel
 - 1.1 Uranylacetat (1,9 mmol/l) in Natriumchloridlösung (154 mmol/l): 4 g Uranylacetat \times 2 H₂O werden in 5 Liter physiologischer Natriumchloridlösung aufgelöst.
 - 1.2 Perchlorsäure/Perchloratlösung (Merck Nr. 9431) für die Bestimmung von Lösungen mit geringem Eiweißgehalt.
2. Reaktionslösung
Aus Merck System Reagenzien Nr. 14051 und 14055 werden in 1 l Puffer 2 Flaschen Enzymgemisch (5,2 kU/l Glucosedehydrogenase und 0,11 kU/l Mutarotase), 2 Flaschen NAD (1,1 mmol/l) sowie 1 ml Triton X 100 gelöst.
3. Als Glucosestandards werden Lösungen der Firmen Merck (Nr. 9423) und Boehringer (Preciset Glucose) eingesetzt und 2 + 50 mit bidestilliertem Wasser oder Lösung 1.2 verdünnt.
4. Spüllösung für den Probennehmer
1 l bidestilliertes Wasser wird mit 1 ml Triton X 100 versetzt.
5. Reinigungslösung
Zur täglichen Reinigung des Leitungssystems des Gerätes wird alkalische Hypochloritlösung (40 g/l) verwendet. (Verdünnung der Natronbleichlauge 125 g/kg der Firma Nettenheimer u. Simon-Collischon, Frankfurt).

Reagenzien für Vergleichsmessungen

Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase:
Reagenzien von Boehringer, Mannheim (Nr. 15931).
Glucoseoxidase-Perid-Reagenzien von Boehringer, Mannheim (Nr. 124044).

Geräte

Die mechanisierten Bestimmungen werden auf einem Einkanal-Autoanalyser II der Firma Technicon, bestehend aus Pumpe II, Kolorimeter mit 15 mm Durchflußküvette und Filter 340 nm durchgeführt. Der Probensteller von IBM (Sampler Recorder 1084) gewährleistet die Probenidentifizierung und Steuerung des Auswerteprogramms über einen eingebauten Kurzloch-kartenleser (7). Der Einkanalsschreiber wird mit Schreiberpapier mit Einteilungen von 2,5 mg/dl und einem Bereich von 0–500 mg/dl bzw. 0–27,78 mmol/l Glucose betrieben.

Das Fließschema des Analyzers zeigt Abbildung 1. Vom zentrifugierten, enteiweißten Überstand der Proben wird 50 Sekunden lang abgesaugt, mit Lösung 2 versetzt und mit Luft segmentiert. Die Reaktion läuft während des Durchflusses durch die Misch- und Verweilschlangen innerhalb 13 Minuten ab. Diese Zeit ist ausreichend, um selbst bei Proben mit einer Glucosekonzentration von 25 mmol/l bei längerem Absaugen ein stabiles Plateau zu erhalten, sodaß kleinere Veränderungen in der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten nicht in das Ergebnis eingehen können. Anschließend wird das gebildete NADH bei 340 nm nach Abtrennung der Luft in der Durchflußzelle gemessen.

Einzelbestimmungen werden am Photometer Eppendorf (M 1101) manuell durchgeführt.

Durchführung und Ergebnisse der Analysen

Kapillartechnik

Die Probenentnahme – Kapillarblut – erfolgt mit einer 20 μ l Glas-kapillare, die luftblasenfrei ohne äußere Benetzung gefüllt wird. Die gesamte Kapillare wird sofort in ein Mikrogefäß mit 500 μ l Enteiweißungslösung gegeben, und durch gründliches Schütteln des verschlossenen Gefäßes wird die Probe aus der Kapillare in die Enteiweißungslösung überführt. Eiweißarme und eiweißfreie Lösungen werden mit Lösung 1.2 verdünnt. Der Eiweißniederschlag wird abzentrifugiert (1 Minute, 7500 g). Die Probe ist damit für die mechanisierte Analyse oder für die manuelle Bestimmung vorbereitet.

Zur Abschätzung eines möglichen Fehlers, der durch die Kapillartechnik bei der Probenentnahme verursacht wird, wurde ein Glucosestandard aus dem kritischen Bereich von 2,8 mmol/l Glucose eingesetzt.

Eine Zehnfachanalyse in Kapillartechnik und der direkte Einsatz des 2 + 50 vorverdünnten Standards ergab die gleichen Werte (Tab. 1).

Analysen mit dem Autoanalyser II

Durchführung der Analysen

Die Proben werden mit einer Frequenz von 60/h aus den Mikrogefäßen angesaugt und bestimmt. Das Saug-/Wachverhältnis beträgt 50 : 10.

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgt an zwei Punkten. Zwei Proben mit destilliertem Wasser und zwei Glucosestandards 300 (300 mg/dl entsprechend 16,67 mmol/l) werden zu Beginn jeder Serie mitgeführt, um Photometer und Schreiber auf die Sollwerte 0 und 300 einstellen zu können.

Die Präzision wird durch ein Testserum in jeder Serie geprüft (Monitrol II Lot Nr. XPT 62, Merz und Dade).

Die Richtigkeit wird täglich mit Precinorm U (606, Boehringer, Mannheim) kontrolliert.

Jede Serie setzt sich aus zwei Leerwerten, zwei Glucosestandards, bis zu 20 Proben und einem Testserum zusammen. Ein konstanter Durchfluß im Autoanalyser mit 817 ± 20 Sekunden Durchlaufzeit, die für die direkte Probenidentifizierung und Auswertung Voraussetzung ist, wird sicher gewährleistet. (N = 40; \bar{x} = 813 s; Standardabweichung: 4 s; Variationskoeffizient: 0,4%).

Die Auswertung erfolgt on-line durch das EDV-System der Klinik (7), die Serien werden durch eine Laborschreibmaschine ausgedruckt.

Linearität und Richtigkeit

Die Linearität wurde durch Analysen wäßriger Glucosestandardlösungen überprüft. Abbildung 2 zeigt, daß bis

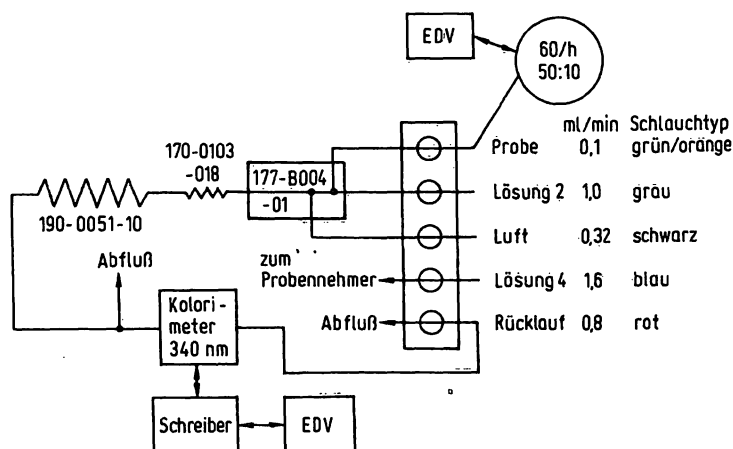


Abb. 1. Fließschema zur Glucose-Bestimmung mit Glucosedehydrogenase auf dem Autoanalyser II.

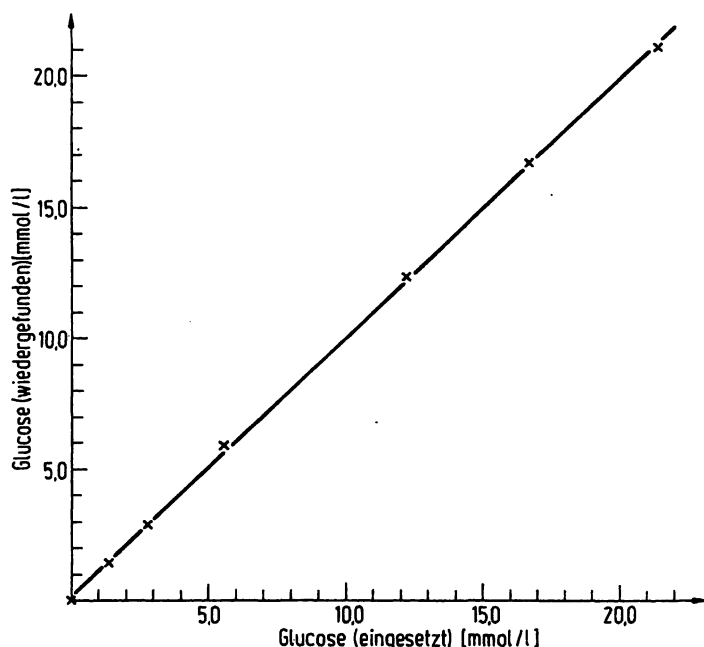


Abb. 2. Glucose-Bestimmung mit Glucosedehydrogenase auf dem Autoanalyzer II. Prüfung der Linearität und Richtigkeit mit wässrigen Standardlösungen.

Tab. 1. Einfluß der Probennahme mit einer 20 µl-Kapillare auf Präzision und Richtigkeit.

	Glucose \bar{x} (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	N
Kapillartechnik	2,86	0,03	1,0	10
Vorverdünnung 2 + 50	2,85	0,03	1,0	10

zu Konzentrationen von 22 mmol/l Glucose die theoretische Menge wiedergefunden wird.

Die Richtigkeit für Serumanalysen wurde an Hand von Kontrollseren festgestellt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2 aufgeführt. Unsere Bestimmungen weichen bei den Seren nur um maximal 2,5% von den angegebenen Mittelwerten ab.

Präzision

Die Untersuchungen zur Präzision wurden in einem Zeitraum von sieben Monaten von verschiedenen Assistentinnen während des Routinebetriebs durchgeführt.

Als *Gerätepräzision* wird hier die für eingewogene, 2 + 50 vorverdünnte Standards ermittelte Präzision in der Serie bezeichnet. Im Bereich von 22,51 mmol/l beträgt die Standardabweichung 0,13 mmol/l (N = 20). Bei einer Konzentration von 1,6 mmol/l Glucose nimmt die Standardabweichung den Wert 0,18 mmol/l an (N = 10).

Die Meßwerte für die *Präzision in der Serie* schließen den Probennahmefehler mittels Kapillartechnik ein. Für drei Seren verschiedener Glucosekonzentrationen sind die Ergebnisse in Tabelle 3 zusammengestellt.

Für die *Langzeitpräzision* gibt Tabelle 4 die Ergebnisse mit fünf Testseren und einem Glucosestandard wieder. Die Langzeitmessungen (8,9) an Monitrol II Lot XPT 62 wurden mit der Glucosedehydrogenase-Methode begonnen, nachdem schon etwa 300 Meßwerte mit der Glucoseoxidase-Perid-Methode am Autoanalyzer vorlagen. Diese Methodenumstellung erbrachte eine Verbesserung des Variationskoeffizienten von 4,1 auf 2,3%.

Tab. 2. Richtigkeitskontrolle mit käuflichen Seren und Standards.

	Glucose Sollwert (mmol/l)	Istwert \bar{x} (mmol/l)	Bemerkung
Monitrol II (46 A)	11,8 (Glucosedehydrogenase)	11,9	Mittelwert aus sechsfacher Bestimmung an 2 Tagen
Precinorm U (606)	6,22 (Glucosedehydrogenase)	6,37	Mittelwert aus zehnfacher Bestimmung
Fluionorm N (127 D)	5,45 (Hexokinase)	5,33	Mittelwert aus Einzelbestimmungen an 55 aufeinanderfolgenden Werktagen
Monitrol I (137 A, B)	4,33 (Glucosedehydrogenase)	4,45	Doppelbestimmung
Standard 50	2,78 (Einwaage)	2,86	Mittelwert aus zwanzigfacher Bestimmung
Standard 25	1,4 (Einwaage)	1,6	Mittelwert aus zehnfacher Bestimmung

Tab. 3. Präzision in der Serie

Glucose \bar{x} (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	N
12,22	0,15	1,2	17
6,50	0,03	0,4	20
2,91	0,07	2,4	15

Die *Verschleppung* im Analysengerät läßt sich durch eine Testserie aus primären Standards mit einer Konzentration von 16,67 mmol/l und 2,86 mmol/l nach *Hjelm* (10) demonstrieren. Sie ist gering; der Interaktionskoeffizient beträgt $q = 0,006$.

Störungen

Hämolyse: Hämoglobinkonzentrationen im Plasma bis 20 g/l sind ohne Einfluß auf das Ergebnis. Stärkere Hämolyse führt infolge Absorption des Hämoglobins zu falsch hohen Werten.

Bilirubin: Bilirubinkonzentrationen bis 260 $\mu\text{mol/l}$ Serum sind ohne Einfluß. Bei Bilirubinwerten von 700 $\mu\text{mol/l}$ werden die Glucosekonzentrationen um etwa 0,5 mmol/l erhöht ermittelt.

Lipämie: Triglyceridkonzentrationen von 35 mmol/l Serum waren ohne Einfluß.

Eiweiß: Im Bereich von 40 g/l bis 120 g/l Eiweiß im Serum sind keine Einflüsse nachzuweisen. Eiweißkonzentrationen unter 30 g/l führen bei Enteiweißung mit Urylacetat zu Veränderungen im Schreiberbild in Form von schmalen, auf die Peaks aufgesetzten Zacken.

Methodenvergleich

Die guten Übereinstimmungen der beschriebenen Methode mit anderen Mikromethoden wurde durch Vergleichsmessungen an identischen Blutproben bzw. Liquor bewiesen.

Abbildung 3 zeigt den Vergleich mit der manuellen Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode (11) an 172 Wertepaaren.

Im Vergleich mit der Glucoseoxidase-Perid-Methode (12) errechnet sich die Regressionsgerade $y = bx + a$ zu $y = 0,929x + 0,483$ und der Korrelationskoeffizient zu

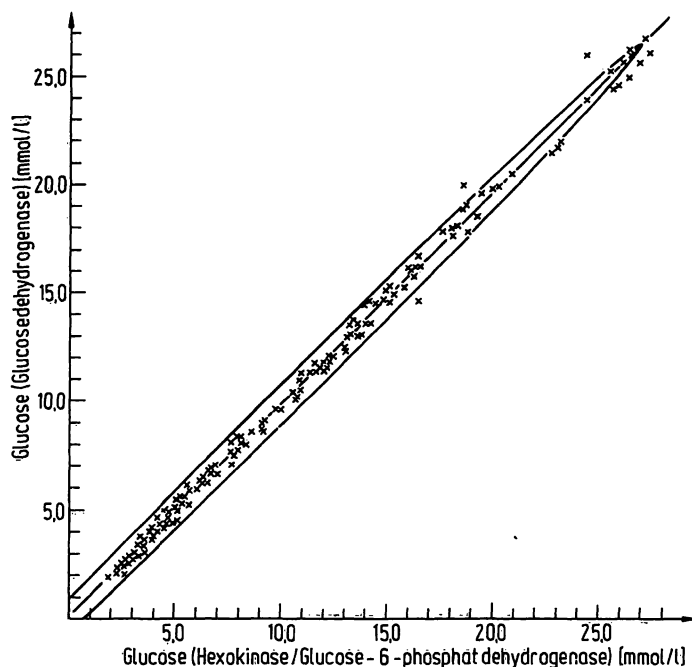


Abb. 3. Glucosebestimmung in Vollblut

Vergleich zwischen Hexokinase-Methode (x) und Glucosedehydrogenase-Methode (y). Ansatz siehe Text. $N = 172$; $\bar{x} = 10,36$; $\bar{y} = 10,25$

Regressionsgerade $y = b_{yx}x + a_{yx}$:

$y = 0,972x + 0,153$; $r = 0,998$:

Regressionsgerade $y = b_{xy}x + a_{xy}$:

$y = 1,025x - 0,121$;

95% Vertrauensbereich von a_{yx} : 0,042 bis 0,263;

95% Vertrauensbereich von b_{yx} : 0,963 bis 0,981;

$s_{y \cdot x} = \pm 0,398$.

$r = 0,994$. $N = 113$ Wertepaare; $\bar{x} = 7,29$; $\bar{y} = 7,25$; 95% Vertrauensbereich von $a = 0,299$ bis 0,666; 95% Vertrauensbereich von $b = 0,907$ bis 0,949; $s_{y \cdot x} = 0,494$.

Vergleiche der mechanisierten (y) mit der manuellen (x) Glucosedehydrogenase-Methode ergeben bei $N = 136$ Wertepaaren folgendes Ergebnis: $y = 0,982x + 0,136$; $\bar{x} = 8,06$; $\bar{y} = 8,05$; $r = 0,999$; 95% Vertrauensbereich von $a = 0,052$ bis 0,220; 95% Vertrauensbereich von $b = 0,974$ bis 0,990; $s_{y \cdot x} = 0,272$.

Manuelle Bestimmungen mit Glucosedehydrogenase

Die Proben werden hierbei einzeln mit dem gleichen Reaktionsgemisch (Lösung 2) wie bei der mechanisierten Analyse bestimmt. 0,1 ml Überstand nach Enteiweißung werden mit 1,0 ml Lösung 2 bei Raumtemperatur 10–15 Minuten inkubiert.

Tab. 4. Langzeitpräzision

Glucose \bar{x} (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	Bemerkungen
22,8	0,2	1,1	Doppelbestimmungen an 10 aufeinanderfolgenden Werktagen Über 1600 Bestimmungen in 9 Monaten an Monitrol II XPT 62. Einzelbestimmungen an 97 aufeinanderfolgenden Werktagen an Preci-norm U.
12,3	0,3	2,3	
6,37	0,17	2,7	
5,3	0,2	3,2	Einzelbestimmungen an 55 aufeinanderfolgenden Werktagen. Doppelbestimmungen an 12 aufeinanderfolgenden Werktagen. Doppelbestimmungen an 9 aufeinanderfolgenden Werktagen mit Glucosestandard 1,4 mmol/l.
4,6	0,1	2,6	
1,4	0,1	9,2	

Tab. 5. Ergebnisse der manuellen Bestimmung mit Glucosedehydrogenase.

Glucose Sollwert (mmol/l)	Istwert \bar{x} (mmol/l)	N	s (mmol/l)	VK (%)	Bemerkungen
1,39	1,4	20	0,1	6,7	wäsr. Glucosestandard
2,78	2,9	7	0,1	3,1	wäsr. Glucosestandard
5,56	5,7	4	0,1	2,4	wäsr. Glucosestandard
16,67	16,3	6	0,3	1,7	wäsr. Glucosestandard
27,78	27,6	6	0,4	1,4	wäsr. Glucosestandard
55,56	54,6	18	0,9	1,7	wäsr. Glucosestandard
	12,2	99	0,2	2,0	Einzelbestimmungen während 25 Tagen mit Monitrol II XPT 62.

Anschließend wird die Absorbanz (A_{334}) der Probe gegen einen Reagenzienleerwert aus 1,0 ml Lösung 2 und 0,1 ml Wasser bei 334 nm und einem Zentimeter Schichtdicke gemessen. Pro Serie genügt ein Leerwert.

Die Berechnung der Glucosekonzentration erfolgt nach:

$$c = A_{334} \times 46 \text{ (mmol/l) oder}$$

$$c = A_{334} \times 828 \text{ (mg/dl)}.$$

Für die manuelle Methode werden mit der Reaktionslösung 2 die gleichen Ergebnisse wie in der Literatur beschrieben (1) erzielt, das zugesetzte Triton X 100 ist ohne Einfluß. Die Enzymkonzentration im Ansatz und die Reaktionszeit bei Raumtemperatur reichen für die Bestimmung bis zu Glucosekonzentrationen von 55 mmol/l ohne Vorverdünnung aus. Auch ein Überschreiten der Reaktionszeit bei Raumtemperatur um 5–10 Minuten führt nur zu einem vernachlässigbaren Absinken der Absorbanz bei 334 nm. Unsere Ergebnisse für Richtigkeit, Linearität und Präzision sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Der Methodenvergleich zwischen manueller Glucosedehydrogenase-Methode (y) und manueller Hexokinase-Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Methode (x) brachte folgende Ergebnisse:

$N = 46$; $\bar{x} = 11,46$; $\bar{y} = 11,23$; $y = 0,997x - 0,193$; $r = 0,999$; 95% Vertrauensbereich von a: $-0,044$ bis $-0,342$; 95% Vertrauensbereich von b: $0,989$ bis $1,006$; $s_y \cdot x = \pm 0,057$.

Diskussion

Das beschriebene System zur Glucosebestimmung wird den Anforderungen hinsichtlich Praktikabilität, Richtigkeit und Präzision gerecht (Tab. 2,4; Abb. 2,3).

Die einheitliche Probennahme und -vorbereitung, die unabhängig von einer sich anschließenden Routine- oder Notfalluntersuchung ist, hat sich bewährt; wir erhalten im Autoanalyzer oder mit der manuellen Methode direkt vergleichbare Resultate bei einem Kapillarblutbedarf von 20 μ l.

Unterschiede in der Glucosekonzentration zwischen venösem Blut und Kapillarblut (13) sowie Serum und Vollblut verlangen eine einheitliche Probennahme. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die kapillare Abnahme keine meßbare Verschlechterung der Präzision bedingt. Damit bildet diese Technik für Patient, Klinik und Labor auch weiterhin die Methode der Wahl.

Die Glucosedehydrogenase-Methode wird sowohl am Autoanalyzer II als auch manuell mit der gleichen Reaktionslösung durchgeführt. Sie ist bei Raumtemperatur mindestens vier Wochen stabil, damit länger haltbar und auch preiswerter als andere enzymatische Verfahren. Der Analysenbereich reicht beim Autoanalyzer II bis 25 mmol/l, bei der manuellen Bestimmung besteht Linearität bis über 50 mmol/l Glucose. Proben mit geringem Glucosegehalt können bis in den Bereich 1,25 mmol/l Glucose noch präzise und richtig bestimmt werden. Uranylacetat zur Enteiweißung ist gegenüber Perchlorsäure weniger aggressiv und bildet einen besser abzentrifugierbaren Niederschlag. Durch die Enteiweißung wird ein Hämolyse-schritt und/oder Dialyseschritt erspart, mit dem Vorteil größerer Betriebssicherheit und sofortiger Inaktivierung der Glykolyse. Der Volumenverdrängungseffekt durch die Enteiweißung liegt wegen der Verdünnung von 1 : 26 mit etwa 0,6% in der gleichen Größenordnung wie bei üblichen Serumanalysen mit Enteiweißung und wird allgemein in Kauf genommen (2).

Der zur mechanisierten Analyse verwendete Autoanalyzer II ist im Aufbau unkompliziert, leicht zu bedienen und problemlos in der Wartung. Dialysatoren und Thermostaten werden nicht benötigt. Die einzigen Verschleißteile sind 5 Pumpenschläuche, deren monatliche Erneuerung für einen sicheren Betrieb ausreicht.

Dominierend für die Verbrauchskosten einer Glucosebestimmung sind die benötigten Enzymmengen. Das beschriebene Verfahren kommt mit einer Menge von 5,2 U Glucosedehydrogenase pro Probe aus, während entsprechende Verfahren am Autoanalyzer die doppelte Menge: 10 (4) bzw. 12,6 (1) U Glucosedehydrogenase pro Probe umsetzen.

Unser System zur Glucosebestimmung mit Glucosedehydrogenase ist seit etwa einem Jahr bei 200–250 Glucosebestimmungen pro Werktag und bei 50–100 Werten an Sonn- oder Feiertagen im Einsatz.

Literatur

1. Banauch, D., Brümmer, W., Ebeling, W., Metz, H., Rindfrey, H., Lang, H., Leybold, K. & Rick, W. (1975) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **13**, 101–107.
2. Gerbig, K. (1976), *Medizin. Laboratorium* **29**, 1–12.
3. Dolhofer, R., Weiss, L. & Wieland, O. H. (1976), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14**, 415–417.
4. Scholer, A. & Pianezzi, A. J. (1976), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14**, 189–195.
5. Richterich, R., *Klinische Chemie* (1965), Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt, p. 190.
6. Stein, W., in Vorbereitung.
7. Bock, H. E. & Eggstein, M. (Hrsg.) (1970), *Diagnostik Informationssystem*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
8. Schmülling, R., Gräser, W. & Eggstein, M. (1975), *Organisation des laboratoires – biologie prospective III^e colloque de Pont-a-Mousson*. L'expansion scientifique française, éditeur p. 147–156.
9. Schmülling, R., Gräser, W. & Eggstein, M. (1975), in: *Methoden der Informatik in der Medizin* (Reichert, P. L. & Holthoff, G. eds.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York p. 159–169.
10. Hjelm, M., (1968), *Z. Anal. Chem.* **243**, 781–790.
11. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974), in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U. ed.) Vol. II, p. 1241–1246. Verlag Chemie Weinheim.
12. Werner, W., Rey, H. G. & Wielinger, H. (1970), *Z. Anal. Chem.* **252**, 224–228.
13. Kaplan, S. A., Yuceoglu, A. M. & Straus, J. (1959), *Pediatrics* **24**, 270–276.

Dr. rer. nat. Wolfgang Stein
Medizinische Klinik, Abt. IV
Otfried-Müller-Str. 10
7400 Tübingen